

明細書

薬剤耐性を獲得した癌細胞の検出方法

5 技術分野

本発明は、染色体の欠失或いは増幅を伴う、制癌剤に対する薬剤耐性を獲得した癌細胞の検出方法に関する発明である。

背景技術

10 これまで、数多くの制癌剤が癌を治療するために使用されているが、重篤な副作用の発生、並びに反復投与により薬剤の効果の消失や不応答性等が重要な問題となっている。それは多くの場合、制癌剤耐性獲得細胞の出現に由来する。薬剤耐性は癌細胞での遺伝子の変化に起因する。その遺伝子産物は、薬剤の細胞内への輸送を低下させる或いは薬剤の細胞内から外への排出を促進させる、薬剤の不活性化、薬剤の解毒を
15 促進させる、プロドラッグ（前駆体）から活性型への転換を抑制する、薬剤の標的蛋白質量の低下或いは活性の低下を誘導する、DNA修復の活性を増大させる、アポトーシスの誘導を抑制すること等がその理由として上げられる（Harrison,D.J. : Molecular mechanism of drug resistance in tumours. J. Pathol., 175, 7-12, 1995）。癌細胞で上記耐性付与が複数同時に起こる場合もある。

20 薬剤耐性癌細胞ではMultidrug resistant protein（多剤耐性蛋白質：MDR及びMRP）と命名された細胞膜に局在するトランスポーターによる細胞からの薬剤の汲み出しが重要な役割を果たしている。例えば、ABCB1(MDR1)或いはABCC1(MRP1)遺伝子の増幅とその結果起こる過剰発現はかなりの数の薬剤耐性細胞に認められる（Kuwano, M., Uchiumi, T., Hayakawa,H., Ono,M., Wada,M., Izumi,H. and Kohno,K. : The
25 basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. Cancer Sci., 94, 9-14, 2003）。MDRをコードする遺伝子群の過剰発現をDNAチップで検出する方法、並びに、その蛋白質群をそれぞれ特異的な抗体を用いて検出する方法等が薬剤耐性癌細胞の検出法として用いられている。MDRは、ATP Binding Cassette (ABC) を有
30 する蛋白質（ABC蛋白質という）に属し、分子量300-2,000程度の両親媒性化合物をATP加水分解のエネルギーを利用して細胞内から細胞外に排出する。

一方、Comparative genomic hybridization (CGH)を用いてプライマリー癌細胞と癌細胞株を解析すると、薬剤耐性と関連するクロモソームの特定領域の変化が見出される。(Wasenius,V.M., Jekunen,A., Monni,O., Joensuu,H., Aebi,S., Howell,S.B. and Knuutila,S. : Comparative genomic hybridization analysis of chromosomal changes occurring during development of acquired resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Genes Chromosomes Cancer*, **18**, 286-291, 1997; Rao,P.H., Houldsworth,J., Palanisamy,N., Murty,V.V., Reuter,V.E., Motzer,R.J., Bosl,G.J. and Chaganti, R.S. : Chromosomal amplification is associated with cisplatin resistance of human male germ cell tumors. *Cancer Res.*, **58**, 4260-4263, 1998; Rooney,P.H., Stevenson,D.A., Marsh,S., Johnston,P.G., Haites,N.E., Cassidy,J. and McLeod,H.L. : Comparative genomic hybridization analysis of chromosomal alteration induced by the development of resistance to thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res.*, **58**, 5042-5045, 1998; Leyland-Jones,B., Kelland,L.R., Harrap,K.R. and Hiorns, L.R.: Genomic imbalances associated with acquired resistance to platinum analogues. *Am. J. Pathol.*, **155**, 77-84, 1999; Struski,S., Doco-Fenzy,M., Trussardi,A., Masson,L., Gruson,N., Ulrich,E., Proult,M., Jardillier,J.C., Potron,G. and Cornillet-Lefebvre,P. : Identification of chromosomal loci associated with non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to topoisomerase II inhibitor in lung adenocarcinoma cell line by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, **30**, 136-142, 2001)。

薬剤耐性癌細胞に特徴的なゲノムの増幅並びに欠失は制癌剤耐性に寄与している可能性が高いと考えられるので、この領域を同定することは極めて重要である。しかしながら、癌細胞の薬剤応答性は多様であり、現在までに見いだされている知見では、薬剤耐性細胞を検出するには十分ではなく、新たなマーカーを見いだすことが必要であることは疑いがない。また、薬剤耐性癌細胞の解析を系統的に行い、癌細胞の薬剤耐性能を効率的かつ網羅的に検査できる方法もまた、未だ確立されていない。

よって、本発明が解決すべき課題は、薬剤耐性癌細胞を検出可能な新たな遺伝子マーカーを見いだし、かつ、当該マーカーを用いた薬剤耐性癌細胞の効率的かつ網羅的な検出手段を提供することにある。

発明の開示

本発明者は、特に副作用が重篤で、癌患者に投与する頻度が高い制癌剤として、カンプトテシン（CPT）類、シスプラチン（CDDP）類、エトポシド（VP-16）類、アドリアマイシン（ADM）およびシトシンアラビノシド（Ara-C）類の薬剤耐性癌細胞株と親癌細胞株における遺伝子増幅または欠失を解析することにより、癌細胞の薬剤耐性獲得に関連する新たな遺伝子マーカーを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、被験癌細胞における、ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB 1 0 遺伝子、ABCC 4 遺伝子、ABCC 9 遺伝子、ABCD 3 遺伝子、ABCD 4 遺伝子、ABCE 1 遺伝子、ABCF 2 遺伝子、BCL2L2、BCL2L10、BCL2L1、および、BCL2A1 からなる群の ABC トランスポーター系遺伝子または BCL2 ファミリー遺伝子から選ばれる 1 種以上の遺伝子の増幅を検出することにより、当該被験癌細胞における制癌剤に対する薬剤耐性の獲得を検出する検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。

（１）本検出方法

上記に列挙した制癌剤のうち、「カンプトテシン類」としては、カンプトテシンの他に、カンプトテシン誘導体として、第一製薬が開発した DX-8951、イタリア・メナリーニ社が開発した T-0128、イギリス・スミスクライン・ビーチャム社が開発した塩酸ノギテカンが挙げられる。「シスプラチン類」は、白金製剤（プラチナを含有する）ともいい、シスプラチン、ビンブラスチン、カルボプラチンが挙げられる。「エトポシド類」として、エトポシドの他に、エトポシド誘導体として、日本化薬が開発した NK611（エトポシド誘導体錠）が挙げられる。「シトシンアラビノシド類」として、シトシンアラビノシドの他に、シトシンアラビノシド誘導体として、そのフッ素化誘導体であるゲムシタビンが挙げられる。

本検出方法において、制癌剤に対する耐性獲得のマーカーとして定義される上記に列挙した遺伝子の中で、ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB 1 0 遺伝子、ABCC 4 遺伝子、ABCC 9 遺伝子、ABCD 3 遺伝子、ABCD 4 遺伝子、ABCE 1 遺伝子および ABCF 2 遺伝子は、いずれも ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーター系蛋白質をコードする遺伝子である。

ABC トランスポーターファミリーに属する蛋白質は、イオンから高分子蛋白質に至るまで非常に広範囲の物質のトランスポートに関与している。ABCB1 (MDR1) 遺伝子と ABCC 1 (MRP1) 遺伝子は細胞内からの薬剤の流出を増大させることにより多

数の薬剤に対する耐性を誘導することが知られている (Ling, V.: Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**, S3-S8, 1997)。また、ABC11 遺伝子はカンプトテシン耐性白血病株で増幅しており、その過剰発現はタキソール耐性を誘導することが知られている

- 5 (Childs, S., Yeh, R.L., Hui, D. and Ling, V.: Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.*, **58**, 4160-4167, 1998)。

本発明は、上記 3 種類の遺伝子に加えて、新たに上記の 10 種類の ABC トランスポーター遺伝子群 (ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB10 遺伝子、ABCC4 遺伝子、ABCC9 遺伝子、ABCD3 遺伝子、ABCD4 遺伝子、ABCE1 遺伝子および ABCF2 遺伝子) が薬剤耐性に関与することを明らかにした。例えば、エトポシド耐性ヒト大腸癌 (HT-29/ETP) 細胞で増幅しているクロモソーム 16p12-p13 の領域では ABCC1 遺伝子よりもむしろ ABCA3 遺伝子が増幅しかつ過剰発現しており、従って、ABCA3 遺伝子が ABCC1 遺伝子よりもアンプリコン (遺伝子増幅を示す領域) として可能性が高いことが判明した。ABCC9 遺伝子は ATP-感受性 K⁺チャネルの構成要素をコードする遺伝子である (Seino, S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies, *Annu. Rev. Physiol.*, **61**, 337-362, 1999)。ABCC9 遺伝子はエトポシド耐性を示す肺癌 (SK3/VP16) 細胞と卵巣癌 (SKOV3/VP) 細胞で増幅していることが判明した。

20 前者の細胞では ABCC9 遺伝子の発現上昇が確認された。その他、後述するように、ABCA3 遺伝子の増幅がエトポシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCB6 遺伝子の増幅がカンプトテシン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCB8 遺伝子の増幅がシスプラチン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCB10 遺伝子の増幅がカンプトテシン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCC4 遺伝子の増幅がシスプラチン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCD4 遺伝子の増幅がアドリアマイシンに対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCE1 遺伝子の増幅がカンプトテシン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、ABCF2 遺伝子の増幅がシスプラチン類に対する薬剤耐性獲得の指標であることが明らかとなった。

25

また、本検出方法において、制癌剤に対する耐性獲得のマーカーとして定義される上記に列挙した他の遺伝子である、BCL2 ファミリー遺伝子は、制癌剤によるアポトーシス死を抑制する働きをする遺伝子である。本作用を利用して癌細胞に多剤耐性を

30

付与することから、BCL2 は、多剤耐性蛋白質と推定される。抗アポトーシスの作用を有する、特定の BCL2 ファミリーの遺伝子（BCL2 遺伝子、BCLXL 遺伝子、MCL1 遺伝子）は、その過剰発現により、癌細胞に対して臨床的に使用される薬剤に耐性を誘導することが判明している（Reed J.C. Dysregulation of apoptosis in cancer. J.

5 Clin. Oncol., 17, 2941-2953, 1999）。

本発明では、上記の他の BCL2 ファミリーの遺伝子（BCL2L2 遺伝子、BCL2L10 遺伝子、BCL2L1 遺伝子および BCL2A1 遺伝子）もまた、薬剤耐性獲得の指標として用いることが可能であることを見いだした。すなわち、BCL2L2 遺伝子の増幅が、カントプラチン類、シスプラチン類、エトポキシド類またはシトシンアラビノシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、BCL2L10 遺伝子の増幅が、カントプラチン類、シスプラチン類またはシトシンアラビノシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、BCL2L1 遺伝子の増幅が、カントプラチン類、シスプラチン類、エトポキシド類またはシトシンアラビノシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であることが明らかとなった（後述する）。

15 上に列挙した、新規の癌細胞の薬剤耐性獲得のマーカーとして用いることが可能な、ABC トランスポーター系遺伝子および BCL2 ファミリー遺伝子は、個々が独立した遺伝子であり、かつ、本来的癌細胞の変異の多様性を鑑み、さらに本明細書の実施例においても、個々のマーカー毎に指標となる癌細胞の薬剤耐性獲得が異なる場合が多い。よって、上に列挙した遺伝子マーカー一つ一つが、独立した遺伝子マーカーとしての
20 価値を有するものであるといえる。また、逆に、これらの一つ一つの遺伝子マーカーを多数組み合わせ、その検出結果を勘案することにより、網羅的な制癌剤耐性の検出が可能となる。

また、上記の新規に提供される制癌剤に対する耐性獲得の遺伝子マーカーに加えて、既知の同遺伝子マーカーを組み合わせ、被験癌細胞の制癌剤に対する耐
25 性の獲得を、いっそう的確に行うことができる。

かかる既知の制癌剤に対する耐性獲得の遺伝子マーカーとしては、例えば、ABCB1 遺伝子、ABCC1 遺伝子、ABCB11 遺伝子等の ABC トランスポーター系遺伝子； BCL2 遺伝子、MCL1 遺伝子、BCLXL 遺伝子等の BCL2 ファミリーの遺伝子； DCK1 遺伝子、TOP1 遺伝子等の DNA 合成関連遺伝子を例示することができる。これらのうち、
30 ABC トランスポーター系遺伝子と BCL2 ファミリーの遺伝子については、上述した通りである。

DCK1 遺伝子、TOP1 遺伝子等の DNA 合成関連遺伝子は、以下のような遺伝子である。

シトシンアラビノシド (Ara-C) はデオキシシチジンリン酸化酵素 (DCK) により活性型リン酸化体 (1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate) に変化する。

- 5 それが DNA へ取り込まれることにより殺細胞効果を発揮する。従って、DCK 酵素活性の低下は Ara-C に対する耐性を誘導することが報告されている (Funato,T., Satou,J., Nishiyama, Y., Fujimaki, S., Miura,T., Kaku,M., and Sasaki, T : In vitro leukemia cell models of Ara-C resistance, Leuk. Res., 24, 535-541, 2000)。本明細書においても、Ara-C 耐性白血病 (K562/AC) 細胞では DCK 遺伝子が半接合体で、
- 10 その結果、DCK 遺伝子発現が減少し、Ara-C 耐性を誘導していることを開示した。

- トポイソメラーゼ (Topo) I と Topo II α は、1 本鎖 DNA 並びに 2 本鎖 DNA にニックを入れ、複製中に DNA 鎖を分離させることにより DNA 複製を予定通り進行させる。カンプトテシン (CPT) は Topo I、をエトポシド (VP-16) は Topo II α を阻害することにより DNA 複製を阻害する。これまでの知見により、細胞内 Topo I、Topo II
- 15 α のレベルと薬剤感受性が相関することが知られている。すなわち、両酵素の濃度が高いと制癌剤感受性が高く、その濃度が低いと制癌剤感受性が低いことが知られている (Yanase,K., Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Oh-Hara, T., Andoh,T., and Tsuruo,T. : Identification and characterization of a deletion mutant of DNA topoisomerase I mRNA in a camptothecin-resistant subline of human colon carcinoma, Jap. J. Cancer Res., 91, 551-559, 2000; McLeod, H.L., and Keith, W.N. : Variation in topoisomerase I gene copy number as a mechanism for intrinsic drug sensitivity., Br. J. Cancer, 74, 508-512, 1996; Withoff,S., Keith,W.N., Knol,A.J., Coutts,J.C., Hoare,S.F., Mulder,N.H., and de Vries,E.G. : Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II a gene copies in a doxorubicin-resistant cell line
- 20 panel., Br. J. Cancer, 74, 502-507, 1996; Sugimoto,Y., Tsukahara,S., Oh-hara T., Isoe, T., and Tsuruo, T : Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody, Cancer Res., 50, 6925-6930, 1990)。後述するように、TOP1 遺伝子発現のレベルは 3 種類のカンプトテシン耐性細胞、カンプトテシン耐性大腸癌 (HT-29/CPT) 細胞並びにカンプトテシン耐性胃癌 (St-4/CPT) 細胞、すなわち、試験した全てのカンプト
- 30 テシン耐性細胞で低かった。その理由は、TOP1 遺伝子コピー数がそれらの親株より

低いためであった。TOP1 遺伝子が局在する染色体 20q の領域の増幅が大腸癌細胞、胃癌細胞で起こっていることが知られている (Knuutila,S., Bjorkqvist,A.M., Autio,K., Tarkkanen,M., Wolf,M., Monni,O., Szymanska,J., Larramendy,M.L., Tapper,J., Pere,H., El-Rifai,W., Hemmer,S., Wasenius,V.M., Vidgren,V., and

5 Zhu,Y. : DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am. J. Pathol.*, 152, 1107-1123, 1998)。

実際、本明細書においても、TOP1 遺伝子のコピー数が親株の感受性細胞で有意に多い、すなわち、HT-29 細胞で 5 倍に、St-4 細胞で 6 倍に増大していたことを開示した。

また、カンプトテシン耐性大腸癌 (HT29/CPT) 細胞で、2 対の TOP1 遺伝子の 1 対

10 は TOP1 欠失体であることを見出した。その結果、TOP1 遺伝子発現の低下が直接カンプトテシン耐性の原因であることが明らかとなった。

また、5 種類のエトポシド耐性細胞は、その親株より TOP2A 遺伝子発現が低く、染色体上の遺伝子コピー数は各々 3 コピーに減少していた。従って、TOP1 と TOP2A 遺伝子コピー数の減少がそれらの遺伝子発現を減少させ、カンプトテシン耐性並びに

15 エトポシド耐性をもたらしと結論付けられる。さらに、チミジン合成酵素遺伝子並びにデヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ遺伝子もそれらのコピー数の減少は薬剤耐性を誘起することが容易に考えられる。

本検出方法は、例えば、CGH 法、フローサイトメトリー法、ELISA 法、DNA チップ法、定量 PCR 法により行うことが可能であり、DNA チップ法または CGH 法

20 を行うことが好適であり、CGH 法を行うことが特に好適である。

「フローサイトメトリー法」は、例えば、リンパ性白血病細胞で発現している ABC 蛋白質を測定する場合、まず、その FITC (Fluorescein isothiocyanate) 標識 CD45

モノクローナル抗体を用いて、リンパ球をフローサイトメトリーにより分取する。次に、Cy3 等の蛍光色素標識抗 ABC 蛋白質抗体を用いて、リンパ性白血病細胞で発現

25 している ABC 蛋白質を測定することができる。本法は癌細胞膜表面に発現している蛋白質の検出に適している。

「ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法」は、例えば、2 種類の抗 ABC 蛋白質抗体を使用するサンドイッチ ELISA 法が一般的である。これ以外にも 1 種類の抗 ABC 蛋白質を使用する競合法がある。前者の方法は 1 種類の抗 ABC 蛋白質

30 抗体をプレート上に固相し、癌細胞抽出液を加えて抗体と結合した ABC 蛋白質をもう一方の抗体で検出する方法である。具体的には、もう一方の抗体を標識する、ある

いは、その抗体をアルカリホスファターゼ標識抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体等で検出する方法である。本法は特異的抗体を使用することにより、細胞内で発現するような蛋白質にも適用可能である。

「DNA チップ法」は、癌細胞で発現している mRNA を定量する方法である。例えば、基盤上に ABC 蛋白質群をコードする遺伝子を一部有する合成オリゴヌクレオチドを固定する（cDNA を固定することもできる）。癌細胞から調製した RNA をリバーストランスクリプターゼにより cDNA を合成する時に標識を行う。本標識 cDNA と基盤上の合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、結合した標識の量をスキャンすることにより mRNA の発現量を測定することができる。本発明は、この DNA チップ法で用いることができる DNA チップ、すなわち、「ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB10 遺伝子、ABCC4 遺伝子、ABCC9 遺伝子、ABCD3 遺伝子、ABCD4 遺伝子、ABCE1 遺伝子、ABCF2 遺伝子、BCL2L2 遺伝子、BCL2L10 遺伝子、BCL2L1 遺伝子、および、BCL2A1 遺伝子からなる群の ABC トランスポーター系遺伝子または BCL2 ファミリー遺伝子から選ばれる 1 種以上の遺伝子を含む DNA（cDNA であっても合成オリゴヌクレオチドであってもよい）」を定着させた DNA 定着基盤をも提供する発明である（基盤の素材、製造工程等は、後述する CGH アレイとして用いる DNA 定着基盤に準ずる）。

「定量 PCR 法」は、被験 DNA の特定遺伝子（癌細胞の薬剤耐性獲得によって増幅または欠失する遺伝子）を含む領域をリアルタイム PCR 法にて増幅させて、当該被験 DNA 由来のリアルタイム PCR 増幅産物とコントロール（健常細胞の DNA 由来の同一の遺伝子増幅用プライマーを用いて同一の条件で PCR 法による遺伝子増幅を行った結果得られた遺伝子増幅産物）の生成物を定量し比較することにより、当該特定遺伝子の増幅または欠失を検出する方法である。

（2）CGH（Comparative Genomic Hybridization）法、または、DNA チップ法による本検出方法

この態様の本検出方法は、それぞれ異なる蛍光色素で標識した対照 DNA と薬剤耐性の獲得を検出する対象となる被験癌細胞の DNA を、上記 DNA 定着基盤上において同時に接触させてハイブリダイズを行うことにより得られる蛍光色を指標として、被験 DNA の特定領域の増幅または欠失を定量的に検出する、薬剤耐性獲得癌細胞の検出方法である。

CGH 法または DNA チップ法に用いるヒト DNA の定着基盤

これらのDNA検出法に用いるDNA定着基盤（本発明は、当該DNA定着基盤をも提供する発明である）に定着させるヒトDNAは、選択する検出法に応じて選択することが可能である、すなわち、本検出方法の態様として、DNAチップ法を行う場合には、cDNAまたは合成オリゴヌクレオチドが挙げられる。また、CGH法を行う場合には、ゲノムDNAが挙げられる。

DNAの採取、調製は、常法により行うことも可能であり、特に対照DNAは市販品を用いることも可能である。

本検出方法において特に好適な態様として、CGH法を、特定のゲノムDNA領域を有するBAC（Bacterial Artificial Chromosome）DNA、YAC（Yeast Artificial Chromosome）DNA、または、PAC DNA（Phage Artificial Chromosome）DNAから得られる複数種類の遺伝子増幅産物が、当該遺伝子増幅産物毎に定着している基盤を用いる態様を挙げることができる。

すなわち、癌細胞の制癌剤に対する耐性の獲得に伴い、増幅または欠失しているゲノムの領域は巨大である場合も認められる。このように、本定着基盤においては、一単位として巨大な遺伝子が反映されているゲノムDNAを定着する必要がある、かかる必要性を満足することができる程度に、許容される遺伝子の組み込み容量が大きな、BAC DNA、YAC DNA、または、PAC DNA（以下、BAC DNA等ともいう）を用いる必要がある。本発明に用いることができるBAC DNA等は、常法により、用いるゲノムを組み込んで得られる遺伝子ライブラリーから選択してもよいし、市販されている遺伝子ライブラリーから選択してもよい。各目的に応じて選択されるべきBAC DNAまたはPAC DNAについては後述する。選択されたクローンが組み込まれた宿主を培養し、BAC DNA等の精製を行うことができる。

このように通常に得られるBAC DNA等は、ゲノムDNA定着基盤を多数製造して実用化するには少量であるので、当該DNAを遺伝子増幅産物として得る必要がある（この遺伝子増幅行程を「無尽蔵化」ともいう）。無尽蔵化においては、まずBAC DNA等を、4塩基認識酵素、例えば、RsaI、DpnI、HaeIII等で消化した後、アダプターを加えてライゲーションを行う。アダプターは10～30塩基、好適には15～25塩基からなるオリゴヌクレオチドで、2本鎖は相補的配列を有し、アニーリング後、平滑末端を形成する側の3'-末端のオリゴヌクレオチドをリン酸化する必要がある。次に、アダプターの一方のオリゴヌクレオチドと同一配列部分を有するプライマーを用いて、PCR（Polymerase Chain Reaction）法により増幅し、無尽蔵化することができる。

一方、各 BAC DNA 等に特徴的な 50～70 塩基のアミノ化オリゴヌクレオチドを、検出用プローブとして用いることもできる。

- 5 このようにして無尽蔵化した BAC DNA 等（これ以外の態様のゲノム DNA、c DNA、合成オリゴヌクレオチドでも同様）を基盤上、好適には固体基盤上に定着させることにより、所望する DNA 定着基盤を製造することができる。

固体基盤としては、ガラス、プラスチック、メンブレン、3 次元アレイ等があげられ、スライドガラス等のガラス基板が好ましい。ガラス等の固体基盤は、ポリ-L-リジン、アミノシラン、金・アルミニウム等の凝着により基盤をコートすることがより好ましい。

- 10 上記の無尽蔵化した DNA（これ以外の態様のゲノム DNA、c DNA、合成オリゴヌクレオチドでも同様）を基盤上にスポットする濃度は、好ましくは 10pg/μl ～5 μg/μl、より好ましくは 1ng/μl ～200 ng/μl である。スポットする量は好ましくは 1nl ～1μl、より好ましくは 10nl～100nl である。また、基盤に定着させる個々のスポットの大きさ及び形状は、特に限定されないが、例えば、大きさは直径 0.01～1mm であり得、上面から見た形状は円形～楕円形であり得る。乾燥スポットの厚みは、特に制限はないが、1～100μm である。さらに、スポットの個数は、特に制限はないが、使用する基盤あたり 10～50,000 個、より好ましくは 100～5,000 個である。それぞれの DNA は Singular から Quadruplicate の範囲でスポットするが、Duplicate 或いは Triplicate にスポットすることが好ましい。

- 20 乾燥スポットの調製は、例えば、スポンターを用いて無尽蔵化した BAC DNA 等（これ以外の態様のゲノム DNA、c DNA、合成オリゴヌクレオチドでも同様）を基盤上にたらし、複数のスポットを形成した後、スポットを乾燥することにより製造することができる。スポンターとしてインクジェット式プリンター、ピンアレイ式プリンター、バブルジェット式プリンターが使用できるが、インクジェット式プリンターを使用することが好ましい。例えば、Cartesian Technologies 社（米）のハイスループット インクジェット分注システム SQ シリーズ等を使用できる。

- 25 このようにして無尽蔵化した BAC DNA 等（これ以外の態様のゲノム DNA、c DNA、合成オリゴヌクレオチドでも同様）を基盤上、好適には固体基盤上に定着させることにより、所望する DNA 定着基盤を製造することができる。

30 検出の態様

上述した DNA 定着基盤を用いて、被験 DNA の特定領域の増幅または欠失を定量

的に検出する場合、特定領域のゲノムDNA等の断片が、好適には網羅的に定着している本定着基盤に、それぞれ異なる蛍光色素で標識した対照ゲノムDNA等（正常細胞または正常組織のゲノムDNA等）と被験ゲノムDNA等（薬剤耐性を獲得しているか否かを検出する対象となる癌細胞または癌組織のゲノムDNA等）を同時に接触
5 させてハイブリダイズを行うことにより得られる蛍光色を指標として、被験ゲノムDNA等の特定領域の増幅または欠失を定量的に検出する検出方法である。

被験ゲノムDNA等の特定領域の増幅または欠失を定量的または定性的に検出することにより、被験癌細胞の制癌剤に対する耐性の獲得の有無、耐性の種類等を明らかにすることができる。

- 10 ヒトゲノムDNA等は市販品を使用することが可能であり、健常人から採血した血漿より、常法により抽出することもできる。また、癌患者本人の正常組織から常法に従い得ることも可能である。

- 対照ゲノムDNA等（正常細胞または正常組織のゲノムDNA等）と被験ゲノムDNA等（薬剤耐性を獲得しているか否かを検出する対象となる癌細胞または癌組織のゲノムDNA等）は、それぞれ異なる蛍光色素、例えば、Cy3とCy5等、を常法（例
15 えば、dCTPを用いたニックトランスレーション法）により標識することができる。このdCTPを用いたニックトランスレーション法を行う標識キットは、PanVera社（日本代理店：宝酒造株式会社）、Invitrogen社（CA、USA）等で販売されている。標識DNAをCGHアレイにプリントしたDNAとハイブリダイズする時にはCot-1DNA、
20 ホルムアミド、Dextran Sulfate、SSC（150mM NaCl/15mM Sodium Citrate）、Yeast t-RNA、SDS（Sodium Deoxysulfate）を加えることがより好ましい。また、標識DNAを含む溶液を熱変性させて加えることが好ましい。ハイブリダイズする容器として、ロッキング機能付プラットフォームに乗せることが可能であり、少量の溶液を用いて本定着基盤上でまんべんなく接触できる容器、例えば、ハイブリマンを用いることが
25 より好ましい。ハイブリダイゼーションの温度は30～70℃が好適であり、38～45℃がより好適である。ハイブリダイズの時間は、12～200時間が好適であり、40～80時間がより好適である。本定着基盤の洗浄はホルムアミド、SSC溶液等を用いて室温で行うことができる。この本定着基盤の洗浄は、非特異的シグナルをできるだけなくすために重要なステップであり、室温で洗浄後、同洗浄液を用いて40
30 ～60℃で洗浄し、さらに、SSC-SDSを含む溶液中50℃で洗浄を行い、リン酸バッファー/NP-40を含む溶液に静置し、最後にSSCを含む溶液中で振とうすることが

より好ましい。

また、本検出方法において、ハイブリダイズを行った本定着基盤における蛍光の発生の内容を把握するためには、例えば、スキャナーを用いることができる。当該スキャナーとしては、例えば、GenePix 4000B (Amersham Biosciences K.K.、東京)等を
5 挙げるることができる。結果の解析は、例えば、対照ゲノム DNA を Cy5 で、被験癌細胞由来のゲノム DNA を Cy3 で標識する場合、本定着基盤上の Cy3 蛍光強度の平均と Cy5 蛍光強度の平均を同じ値に補正することが好適である。さらに、各 BAC DNA (各ピクセル)上で Cy3/Cy5 の Ratio を求め Log₂Ratio の値で表示することが好適である。当該蛍光の強度比 (肉眼的には蛍光色) を指標とすることにより、被験癌細胞から得
10 られるゲノム DNA 検体において、検出目的とする遺伝子の特定部分の増幅や欠失が認められるかを定量的 (もちろん定性的にも) に検出することができる。

図面の簡単な説明

図 1 下記細胞株のメタフェーズクロモソームを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイ
15 ザーションによる遺伝子増幅並びに欠失の解析した結果を表す写真である。

(A) ヒト大腸癌細胞 HT-29 株、(B) エトポシド耐性ヒト大腸癌細胞 HT-29/ETP 株、(C) ヒト卵巣癌細胞 SKOV3 株、(D) エトポシド耐性ヒト卵巣癌細胞 SKOV3/VP 株、(E) ヒト白血病 K562 株、(F) シトシンアラビノシド耐性ヒト白血病 K562/AC 株、(G) ヒト大腸癌細胞 HT-29 株、(H) カンプトテシン耐性ヒト大腸癌細胞 HT-29/CPT
20 株

HT-29 細胞は ABCA3 遺伝子に由来する緑色蛍光と ABCC1(MRP1)遺伝子に由来する赤色蛍光が 3 ヶ所に検出された (A)。HT-29/ETP 細胞では ABCA3 遺伝子に由来する緑色蛍光が全染色体中の 7 ヶ所に、ABCC1(MRP1)遺伝子に由来する赤色蛍光が全染色体中の 5 ヶ所に検出された (B)。SKOV3 細胞で ABCA3 遺伝子に由来する緑色
25 蛍光は 7 ヶ所に、HNF3A 遺伝子に由来する赤色蛍光は 4 ヶ所に検出された (C)。SKOV3/VP 細胞では BCL2L2 遺伝子に由来する緑色蛍光は 6 ヶ所に、HNF3A 遺伝子に由来する赤色蛍光は 4 ヶ所に検出された (D)。K562 細胞では DCK 遺伝子に由来する緑色蛍光が 1 ヶ所検出された (E)。K562/AC 細胞では DCK 遺伝子に由来する緑色蛍光が 1 ヶ所検出された (F)。HT-29 細胞では TOP1 に由来する緑色蛍光が 5 ヶ所
30 検出された (G)。HT-29/CPT 細胞では TOP1 に由来する緑色蛍光が 2 ヶ所検出された (H)。

(A) と (B) では ABCA3 遺伝子と ABCC1 遺伝子が非常に近い部位に局在するために、緑色蛍光と赤色蛍光が重なり黄色を呈している。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションで使用した Bacterial Artificial Chromosome (BAC) 並びに P1-Artificial Chromosome (PAC) を下記に示した。

5	<u>遺伝子名</u>	<u>BAC/PAC 名</u>
	ABCA3 遺伝子 (ABC ファミリー遺伝子)	RP11-304L19
	ABCC1 遺伝子 (ABC ファミリー遺伝子)	RP11-516F7
	HNF3A 遺伝子	
	(Hepatocyte nuclear factor 3 ファミリー遺伝子)	RP11-356O9
10	BCL2L2 遺伝子 (BCL2 ファミリー遺伝子)	RP11-124D2
	DCK 遺伝子 (デオキシシチジンキナーゼ遺伝子)	RP11-499N1
	TOP1 遺伝子 (トポイソメラーゼ遺伝子)	RP1-1J6

HT-29/ETP 細胞染色体上のアンプリコン (遺伝子増幅を示す領域) のマップは
 15 16p12-p13 にあり、ABCA3 遺伝子と ABCC1(MRP1)遺伝子が隣接して存在する (I)。
 SKOV3/VP 細胞染色体上のアンプリコンは 14q11-q21 にあり、BCL2L 遺伝子と
 HNF3A 遺伝子が存在する (J)。

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH: Fluorescence *in situ* hybridization)
 は Yasui,K., Imoto,I., Fukuda,Y., Pimkahaokham,A., Yang,Z.Q., Naruto,T.,
 20 Shimada,Y., Nakamura,Y., and Inazawa : Identification of target genes within an
 amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. Genes
 Chromosomes Cancer, 32, 112-118, 2001 の方法に従って行った。

(I) と (J) は BAC 並びに PAC (それらの番号を記載) を標識プローブに用いて
 FISH を行い、エトポシド耐性大腸癌 (HT-29/ETP) 細胞並びにエトポシド耐性卵巣
 25 癌 (SKOV3/VP) 細胞のクロモソーム上での検出部位を→で図中に表示した。その結
 果をクロモソーム上での局在部位、その領域内に存在する STS (Sequence-tagged
 site)、その領域をカバーする BAC 並びに PAC クローン名、それらの BAC 並びに PAC
 をプローブに用いて HT-29/ETP 細胞における本クロモソーム領域の増幅を平均コピ
 ー数で表した。ABCA3 遺伝子、MRP1 遺伝子、BCL2L 遺伝子、HNF3A 遺伝子が存
 30 在するクロモソームの領域を矢印で示した。HT-29/ETP 細胞並びに SKOV3/VP 細胞
 の蛍光写真の右上にはプローブに用いた BAC 名或いは PAC 名を記載した。

図 2. 薬剤耐性細胞株における ABCA3 遺伝子、ABCC1 (MRP1) 遺伝子、BCL2L2 遺伝子及び ABCC9 遺伝子の過剰発現を示す図面である。

- (A) HT-29 細胞及び HT-29/ETP 細胞における ABCA3 及び ABCC1 (MRP) 遺伝子発現の Northern プロット法による解析。これら 2 種類の細胞から 2 μ g のポリ
- 5 (A) RNA を調製し、常法により Northern プロットを行い、上記 2 種類の遺伝子発現量を測定した。ABCA3 遺伝子及び ABCC1 (MRP1) 遺伝子を検出するためのプローブとして各々 IMAGE クローン 179576 及び 2205297 (Incyte Genomics, Palo Alto, CA) を使用した。GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子プローブはサンプル間の誤差を修正するためのスタン
- 10 ードとして使用した。
- (B) SKOV3 細胞及び SKOV3/VP 細胞における BCL2L2 遺伝子発現の Northern プロット法による解析。これら 2 種類の細胞から 2 μ g のポリ (A) RNA を調製し、常法を用いて Northern プロットを行い、BCL2L2 遺伝子発現量を測定した。BCL2L2 遺伝子を検出するためのプローブは 2 種類のプライマー
- 15 (Forward: 5'-TATAAGCTGAGGCAGAAGGG-3' (配列番号 1) と Reverse: 5'-TCAGCACTGTCCTCACTGAT-3' (配列番号 2)) を用いて PCR (polymerase chain reaction) により増幅し、調製した。GAPDH 遺伝子プローブはサンプル間の誤差を修正するためのスタンダードとして使用した。
- (C) SK3 細胞、SK3/VP 細胞、並びに SKOV3/VP 細胞を用いて ABCC9 mRNA の
- 20 発現解析。これらの細胞より RNA を調製し、リアルタイム逆転写-PCR 法 (Yasui, K., Arii, S., Zhao, C., Imoto, I., Ueda, M., Nagai, H., Emi, M. and Inazawa J.: TFDP1, CUL4A and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas, Hepatology, 35, 1476-1484, 2002) を用いて ABCC9 遺伝子 mRNA を定量した。サンプル間の差
- 25 を標準化するために、ABCC9 遺伝子と対照遺伝子 (GAPDH) の発現レベルの比を求め、SK3 細胞での比 (ABCC9 発現量/GAPDH 発現量) を 1 とし、各細胞での ABCC9 遺伝子発現量の相対比を図示した。

図 3. 親株と比較した薬剤耐性細胞株の BCL2 ファミリー遺伝子の発現を示す図面である。

- 30 各細胞で対照遺伝子 (GAPDH) と目的とする遺伝子の発現量の比を求めた。各薬剤耐性細胞の親株の比を 1 とし、各薬剤耐性細胞での発現量の比を示した。遺伝子

発現量はリアルタイム逆転写 PCR により測定した。

左欄には薬剤耐性癌細胞名、各バーグラフの上欄には検討した遺伝子名、下欄には上欄に示した遺伝子の発現量を親株と比較した値で示した。

5 図 4 カスパーゼ活性並びに BCL2 ファミリー遺伝子発現とエトポシド耐性との関係を示す図面である。

(A) エトポシド (VP-16) 処理を行った卵巢癌細胞 (SKOV3 と SKOV3/VP) のカスパーゼ活性を示している。

10 カスパーゼ活性の測定はカロリメトリック CaspACE アッセイシステム (Promega Co., Madison, WI, USA) を用いて説明書に従って行った。SKOV3 細胞と SKOV3/VP 細胞を 100 µg/ml の VP-16、VP-16 とカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK、或いは培地 (コントロール) だけの存在下で 24 時間培養した。細胞をリシスバッファーを用いて溶解し、4℃で 15,000xg 20 分間遠心分離を行い、その上清 (100 µg 蛋白質含有) をカスパーゼ活性測定のための基質 (Ac-DEVD-pNA) と共に 37℃で 4 時間インキュベーションを行い、405 nm の
15 吸光度を測定することにより、その活性を求めた。

(B) BCL2L2 アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理をした SKOV3/VP 細胞での BCL2L2 mRNA の発現レベルを示している。

20 SKOV3/VP 細胞を無処理、トランスフェクション試薬であるオリゴフェクタミン処理、ホスホロチオエート骨格を有する BCL2L2 アンチセンスオリゴヌクレオチド (BCL2L2 cDNA の 2374 番から 2394 番までの配列：
5'-AGCCTACCACCTCCCCTAGAA-3' (配列番号 3)) をオリゴフェクタミン処理によりトランスフェクションした場合、スクランブル配列のホスホロチオエート骨格を有するコントロールオリゴヌクレオチド (配列：
5'-AAGATCCCCTCCACCATCCGA-3' (配列番号 4)) をオリゴフェクタミン処
25 理によりトランスフェクションした場合の各々について、RNA を抽出し、リアルタイム逆転写 PCR 法により、BCL2L2 mRNA 量を測定した。

(C) BCL2L2 遺伝子の発現抑制による SKOV3/VP3 細胞のエトポシド VP-16 に対する感受性の増大について示している。

30 ホスホロチオエート骨格を有する BCL2L2 アンチセンスオリゴヌクレオチドをオリゴフェクタミン処理によりトランスフェクション、スクランブル配列のホスホロチオエート骨格を有するコントロールオリゴヌクレオチドをオリゴフェ

5 クタミン処理によりトランスフェクション、並びに、無処理の条件で SKOV3/VP3 細胞を処理し、24 時間後に図に示した各濃度の VP-16 存在下で細胞を 48 時間培養した。SKOV3/VP3 細胞の生存率をトランスフェクション 72 時間後に Cell-Counting Kit-8 (同仁化学研究所、熊本) を用いてテトラゾリウムアッセイ法により測定した。生存率を % で表示したが、% は上記処理条件下で測定された吸光度を VP-16 無添加・無処理の条件下で測定された吸光度で割り算し求めた。各々の値は 5 回の実験の平均値で、その値は各プロット上の平均値 ± SD で表示した。

10 発明を実施するための最良の形態

[実施例 1] 薬剤耐性癌細胞に特異的に認められる特定のゲノム DNA 領域の変化

15 Subtractive CGH 法は親株のゲノムとそれから誘導した薬剤耐性細胞のゲノム各領域のコピー数を比較し、差し引くことにより遺伝子の増幅の度合いと欠失を定量的に算出する方法である。本法を用いて、親株と比較して 23 種類の薬剤耐性癌細胞で見出された遺伝子の増幅・欠失の変化を表 1 に示した。

(表 1) 親株の癌細胞とそれから誘導した薬剤耐性癌細胞のゲノムを Subtractive CGH 法を用いて検出したクロモソーム異常の領域

No.	細胞株	薬剤名	増幅領域	欠失領域
1	HT-29/CPT	CPT	1q, 4q24-35	11p, 11q23-25, 20p, 20q
2	HT-29/cDDP	CDDP	1q31-32, 1q42-44, 3p21-26, 5p14-15	11p14-15, 15q11-21
3	HT-29/ADM	ADM	6q16-22, 11p, 13q21-22, 14q21-32, 18q12-21	7p21-22, 8q23-24, 9q34
4	HT-29/ETP	VP-16	16p12-13	None
5	A549/CPT	CPT	2q21-37	9q31-34, 11p11-14, 11q14-22, 16q, Xp, Xq
6	St-4/CPT	CPT	None	11p
7	St-4/cDDP	CDDP	None	None
8	A2780/cDDP	CDDP	None	Xp, Xq

9	KK47/DDP10	CDDP	5q14-35,6q24-27, 13q22-34, 14q22-32	5p
10	KK47/DDP20	CDDP	6q21-27, 13q22-34	5p
11	T24/DDP5	CDDP	4p15-16	13q
12	T24/DDP7	CDDP	4p14-16	None
13	T24/DDP10	CDDP	3p22-26,3q13-24,4p,5q14-15, 7q34-36, 12q23-24	13q14-34, 15q11-21
14	U937/clone21	VP-16	2p21-25	None
15	U937/clone26	VP-16	None	None
16	U937/clone41	VP-16	None	None
17	U937/clone49	VP-16	None	18q21
18	U937/UK711	VP-16	None	None
19	K562/AC	Ara-C	1p21-31,7q,11p,15q14-24,20p13, Xp,Xq	2q,4p,4q,5p,11q13-23
20	K562/etop20	VP-16	16p	None
21	K562/etop80	VP-16	14q21-32, 16p, 16q12-13	9p21-24, 12q21-24
22	SK3/VP16	VP-16	2q36-37,4q21-35,7q21-31	3p, 5p, 10q, 20q
23	SKOV/VP	VP-16	1p13-22,5q31-35,11q23-25,12p, 14q11-21,17p	20q12-13

(略号) CPT: カンプトテシン、CDDP: シスプラチン、ADM: アドリアマイシン、

VP-16: エトポシド、Ara-C: シトシチンアラビノシド

HT-29: 大腸癌細胞、A549: 肺癌細胞、SK3: 肺癌細胞、St-4: 胃癌細胞、

A2780: 卵巣癌細胞、SKOV3: 卵巣癌細胞、KK47: 膀胱癌細胞、T24: 膀胱癌細胞、

K562: 白血病細胞、U937: 白血病細胞

5

19種類(全細胞種の83%に相当)の薬剤耐性細胞はDNAコピー数に変化していた。

1細胞の全染色体当たり異常が起こっている箇所は0から12ヶ所の範囲であり、平均値は3.7ヶ所であった。遺伝子増幅は0から7ヶ所の範囲で、平均値が2.1ヶ所であった、欠失は0から6ヶ所の範囲で、平均値が1.6ヶ所であった。遺伝子増幅は4細胞(全細胞種の17%に相当)で共通してクロモソーム14qに見出され、3細胞(全

10

細胞種の 13%に相当) で共通してクロモソーム 4p、6q、7q、13q に見出された。数コピー以上の増幅がカンプトテシン耐性肺癌 (A549/CPT) 細胞のクロモソーム 2q23-q34 領域に、シスプラチン耐性膀胱癌 (T24/DDP10) 細胞のクロモソーム 4p に、エトポシド耐性肺癌 (SK3/VP16) 細胞のクロモソーム 7q21-q22 領域に、シトシンアラビノシド耐性白血病 (K562/AC) 細胞のクロモソーム 15q21-q24 領域に検出された。5 遺伝子欠失は 4 細胞 (全細胞種の 17%に相当) でクロモソーム 5p と 11p に、3 細胞 (全細胞種の 13%に相当) でクロモソーム 11q と 20q に検出された。8 種類のシスプラチン耐性細胞を試験し、共通に認められるクロモソーム増幅の最小領域は 3p22-p26 (大腸癌 HT-29/cDDP 細胞と膀胱癌 T24/DDP10 細胞)、4p15-p16 (膀胱癌 T24/DDP5、10 T24/DDP7 及び T24/DDP10 細胞)、及び 5p15 (大腸癌 HT-29/cDDP 細胞と膀胱癌 T24/DDP10 細胞) であった。シスプラチン耐性細胞で共通して欠失しているクロモソームの領域は、5p (膀胱癌 KK47/DDP10 細胞並びに KK47/DDP20 細胞)、13q14-q34 (膀胱癌 T24/DDP5 及び T24/DDP10 細胞)、及び 15q11-q21 (大腸癌 HT-29/CDDP 並びに膀胱癌 T24/DDP10 細胞) であった。さらに、10 種類のエトポシド耐性癌細胞で 2 種類のクロモソーム領域の変化が共通して検出された。それは、クロモソーム 15 16p12-p13 領域の増幅 (大腸癌 HT-29/ETP 細胞、白血病 K562/etop20 細胞及び白血病 K562etop80 細胞) とクロモソーム 20q12-q13 の領域の欠失 (肺癌 SK3/VP 細胞及び卵巣癌 SKOV3/VP 細胞) である。クロモソーム 11p11-p14 領域の欠失は 3 種類すべてのカンプトテシン耐性細胞 (大腸癌 HT-29/CPT、肺癌 A549/CPT 及び胃癌 20 St-4/CPT 細胞) で共通に認められた。次に、これらのクロモソーム領域の増幅並びに欠失領域に含まれる薬剤耐性と密接に関連する遺伝子群の同定を進めた。

【実施例 2】 ABC トランスポーター遺伝子の増幅と過剰発現

ABC トランスポーターをコードするヒト遺伝子として 48 種類がこれまで知られて 25 いる (Dean, M., Hamon, Y. and Chimini, G. : The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, J. Lipid Res., 42, 1007-1017, 2001)。ここで試験した薬剤耐性細胞中では 20 種類の ABC トランスポーター遺伝子が増幅していた。その中で、17 種類の遺伝子の増幅を FISH 法で確認した。

13 種類の ABC トランスポーターは親株と比較すると 19 種類の薬剤耐性細胞で確 30 実に増幅していた (表 2)。

(表 2) 親株の癌細胞とそれから誘導した薬剤耐性の癌細胞を比較して後者で ABC
トランスポーター遺伝子と Bcl-2 ファミリー遺伝子が増幅している細胞株リスト

ファミリー	遺伝子名	別名	局在クロモ ソーム部位	BAC/PAC 名	細胞株	DNA コ ピー数*
ABC トランスポ ーター						
	ABCA3		16p13.3	RP11-304L19	HT-29/ETP	7 (3)
					K562/etop80	5 (4)
	ABCB1	MDR1	7q21	RP11-212B1	SK3/VP16	11 (3)
	ABCB6		2q33-q36	RP11-803J6	A549/CPT	3 (2)
	ABCB8		7q35-q36	RP11-606P1	T24/cDDP10	5 (4)
	ABCB10		1q42	RP4-613A2	HT-29/CPT	5 (3)
	ABCB11	BSEP	2q24	RP11-704B8	A549/CPT	3 (2)
	ABCC1	MRP1	16p13.1	RP11-516F7	HT-29/ETP	5 (3)
					K562/etop20	4 (3)
					K562/etop80	4 (3)
	ABCC4	MRP4	13q32	RP11-124D15	KK47/cDDP10	3 (2)
	ABCC9	SUR2	12p12.1	RP11-729I10	SK3/VP16	5 (2)
					SKOV3/VP	5 (2)
	ABCD3	PXMP1	1p21-p22	RP11-272P3	SKOV3/VP	5 (3)
	ABCD4	PXMPL1L	14q24.3	RP5-919J22	HT-29/ADM	3 (2)
					KK47/cDDP10	4 (3)
					K562/etop80	3 (2)
	ABCE1	OABP	4q31	RP11-543H9	HT-29/CPT	4 (3)
	ABCF2		7q35-q36	RP4-548D19	T24/cDDP10	5 (4)
Bcl-2						
	BCL2L2	BCL-W	14q11.2-q12	RP11-124D2	SKOV3/VP	6 (2)
	MCL1		1q21	RP11-243G22	HT-29/CPT	4 (3)
	BCL2L10		15q21	RP11-337B11	K562/AC	4 (3)

* 耐性株のコピー数 (その親株のコピー数)

特に、ABCA3 遺伝子、ABCB1(MDR1) 遺伝子、ABCC9 (SUR2) 遺伝子はコピーナンバーで 2 コピー以上の増幅が認められた。CGH 法によりクロモソーム 16p12-p13 領域で遺伝子増幅が検出されたエトポシド耐性大腸癌 HT-29/ETP 細胞では、クロモソーム 16p13.3 に局在する ABCA3 遺伝子の FISH 法で求めたコピー数は 7 コピーで、

5 16p13.1 に局在する ABCC1(MRP1) 遺伝子のそれは 5 コピーであった。一方、HT-29/ETP 細胞の親株 (HT-29) では両遺伝子のコピー数は 3 コピーで、より低い値を示した (図 1 A と B)。この結果は親株が耐性株と比較しエトポシドに感受性がより高いことを示している。FISH 法を用いて、エトポシド耐性大腸癌 (HT-29/ETP) 細胞で増幅された ABCA3 遺伝子が局在するクロモソームの最小の染色体領域を BAC クローン番号 RP11-334D3 (マーカー D16S525 を含む) と RP11-95P2 (マーカー SHGC-11838 を含む) の間に同定した (図 1 I)。クロモソーム 7q21 に局在する ABCB1 遺伝子の FISH 法で求めたコピー数はエトポシド耐性肺癌 (SK3/VP16) 細胞では 1

10 1 コピーであり、親細胞の 3 コピーと比較すると顕著に高い値であった。クロモソーム 12p12.1 に局在する ABCC9 遺伝子の FISH 法で求めたコピー数はエトポシド耐性肺癌 (SK3/VP16) 細胞とエトポシド耐性卵巣癌 (SKOV3/VP) 細胞では 5 コピーであり、親株の 2 コピーより有意に高い値である。次に、これらの遺伝子の増幅はその mRNA の高発現を誘導すると考えられるので、その確認をおこなった。親株並びにその親株より得られた薬剤耐性細胞から RNA を抽出し、Northern ブロットティングを行うと親株の大腸癌 HT-29 細胞と比較して、エトポシド耐性 HT-29/ETP 細胞は ABCA3

20 遺伝子発現が 10.6 倍、ABCC1 遺伝子発現が 2.6 倍増大していた (図 2 A)。この結果より両遺伝子はクロモソーム 16p12-13 領域に存在するが、ABCA3 遺伝子は ABCC1 遺伝子よりもよりエトポシド耐性を付与するより重要な遺伝子である。ABCB1 遺伝子発現はエトポシド耐性肺癌 (SK3/VP16) 細胞では親細胞 (SK3) よりも 3.3 倍高い発現を示した。ABCC9 遺伝子発現は SK3/VP16 細胞では親細胞よりも 13.3 倍高い発現を示した。一方、それはエトポシド耐性卵巣癌 (SKOV3/VP) 細胞ではその親細胞

25 (SKOV3) と比較して 1.6 倍の発現を示すのみであった (図 2 C)。従って、細胞種により薬剤耐性に関与する ABC トランスポーター遺伝子が異なることが示唆される。薬剤耐性を解析するためには、広範囲の ABC トランスポーター遺伝子群を網羅的に解析することが必要となる。

[実施例 3] BCL2 ファミリーに属する抗アポトーシス蛋白質をコードする遺伝子の増幅と高発現

BCL2 遺伝子、BCL2L1(BCLXL) 遺伝子、BCL2L2 (BCLW) 遺伝子、BCL2A1 遺伝子、MCL1 遺伝子及び BCL2L10 遺伝子の各遺伝子群は BCL2 ファミリーに属し、
5 抗アポトーシスの作用を有する制御蛋白質である (Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J.: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.* 13, 1899-1911, 1999)。

BCL2L1(BCLXL) 遺伝子を除く 5 種類の遺伝子は薬剤耐性細胞で遺伝子増幅が認められた。FISH を用いた解析で、それぞれの親株と比較して、エトポシド耐性卵巣癌 (SKOV3/VP) 細胞では BCL2L2 遺伝子の増幅、カンプトテシン耐性大腸癌 (HT-29/CPT) 細胞では MCL1 遺伝子の増幅、シトシンアラビノシド耐性白血病 (K562/AC) 細胞では BCL2L10 遺伝子の増幅が起こっていた (表 2)。この場合、エトポシド耐性卵巣癌 (SKOV3/VP) 細胞ではその親細胞と比較して、クロモソーム 14q11-q21 の領域が増幅しており、クロモソーム 14q11.2-q12 に局在する BCL1L2 遺
10 伝子の FISH 法により求めたコピー数は 6 コピーであった (図 1、C と D)。

Hepatocyte nuclear factor 3 ファミリー遺伝子である HNF3A 遺伝子はクロモソーム 14q12 にマップされ、食道癌である Esophageal squamous cell carcinomas のクロモソーム 14q12-q13 上にこの領域の増幅を誘起するアンプリコンとして見出されている。エトポシド耐性卵巣癌細胞で、HNF3A 遺伝子の FISH 法で求めたコピー数は 4
20 コピーであった (図 1 D)。BCL2L2 遺伝子はエトポシド耐性細胞株 SKOV3/VP 細胞においてクロモソーム 14q11-q21 領域でのアンプリコンとして可能性の高い領域に存在している。さらに、BCL2L2 遺伝子を含むアンプリコンはマーカー D14S879 (BAC クローン RP11-146E13) と SHGC-10164 (BAC クローン RP11-144C18) の間に存在する (図 1 J)。Northern プロット法により BCL2L2 遺伝子の発現を検討した所、親株と
25 比較して SKOV3/VP 細胞ではその遺伝子発現は 3.3 倍に増大していた (図 2 B)。

次に、上記 6 種類の BCL2 ファミリー遺伝子発現を 22 種類の薬剤耐性細胞で比較した (図 3)。BCL2 遺伝子発現は 4 種類の薬剤耐性細胞で親株と比較して 2 倍以上の高レベル発現を示した。同様に BCL2L1(BCLXL) 遺伝子発現は 1 種類の薬剤耐性癌細胞で、BCL2L2 遺伝子発現は 3 種類の薬剤耐性癌細胞で、MCL1 遺伝子発現は 1 種類
30 の薬剤耐性癌細胞で BCL2A1 遺伝子発現は 1 種類の薬剤耐性癌細胞で、BCL2L10 遺伝子発現は 5 種類の薬剤耐性癌細胞でそれぞれの親株と比較して 2 倍以上の高レベル

発現を示した(図2Bと図3)。

- 5 MCL1 遺伝子はカンプトテシン耐性大腸癌 HT-29/CPT 細胞で、BCL2L10 遺伝子はシトシンアラビノシド耐性白血病 K562/AC 細胞で、それらの遺伝子増幅に比例して高い発現をしていた(表2と図3)。従って、BCL2 ファミリー遺伝子の高発現は制癌剤耐性を誘導することが判明し、その遺伝子増幅の解析は薬剤耐性能を検査上で重要
- 10 であることが判明した。

【実施例4】 エトポシド (VP-16) により誘導されたアポトーシスに対する BCL2L2 の影響

- 10 制癌剤によるアポトーシスの誘導に対する BCL2L2 遺伝子発現の影響を検討した。ヒト卵巣癌 SKOV3 細胞とエトポシド耐性卵巣癌 SKOV3/VP 細胞を 100 µg/ml の VP-16 存在下で 24 時間培養し、caspase-3 の活性化に伴うアポトーシスを測定した。その結果、カスパーゼ活性は親株と比較するとエトポシド耐性 SKOV3/VP 細胞では約 1/2 に低下した(図4A)。次に、BCL2L2 遺伝子の役割を解析するために、BCL2L2
- 15 のアンチセンスオリゴヌクレオチドで細胞を処理し、BCL2L2 遺伝子発現を抑制した条件で VP-16 の影響を検討した。トランスフェクション試薬 (Oligofectamine) 単独、BCL2L2 のセンスオリゴヌクレオチド (スクランブル配列のコントロールオリゴヌクレオチド) は影響しないが、BCL2L2 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加すると BCL2L2 遺伝子発現が低下した(図4B)。この条件で SKOV3/VP 細胞のエトポシ
- 20 ド (VP-16) に対する感受性が増大した(図4C)。従って、BCL2 ファミリー遺伝子の増幅がカスパーゼ活性を低下させ、制癌剤耐性を誘導しているといえる。

【実施例5】 DCK、TOP1、TOP2A の遺伝子コピー数と発現レベル

- 25 シトシンアラビノシド耐性白血病 K562/AC 細胞はデオキシシチジンキナーゼ (DCK) 遺伝子が局在するクロモソーム 4q の領域を欠失、カンプトテシン耐性大腸癌 HT-29/CPT 細胞はトポイソメラーゼ 1 (TOP1) が局在するクロモソーム 20q を欠失する。一方、TOP2A が局在するクロモソーム 17q21-22 の領域は5種類のエトポシド (VP-16) 耐性細胞では増幅・欠失は認められない(表1)。シトシンアラビノシド (Ara-C)、カンプトテシン (CPT) 及びエトポシド (VP-16) 耐性細胞で、FISH 法
- 30 を用いて DCK 遺伝子、TOP1 遺伝子、TOP2A 遺伝子のコピー数を求め、リアルタイム逆転写・PCR 法によりそれらの発現レベルを測定した(表3)。

(表 3) シトシンアラビノシド耐性株での DCK 遺伝子、カンプトテシン耐性株での TOP1 遺伝子、並びに、エトポシド耐性株での TOP2A 遺伝子のコピー数とそれら遺伝子の発現レベル

遺伝子名	局在クロモソーム 部位	BAC/PAC 名	細胞株	DNA コピー 数*	遺伝子の相対 的発現量**
DCK	14q13-21	RP11-499N1	K562/AC	1 (2)	0.00
TOP1	20q12-13	RP1-1J6	HT-29/CPT	2 (5)	0.36
			A549/CPT	3 (3)	0.47
			St-4/CPT	3 (6)	0.54
TOP2A	17q21-22	RP11-5809	HT-29/ETP	2 (3)	0.37
			K562/etop20	2 (3)	0.48
			K562/etop80	2 (3)	0.69
			SK3/VP16	4 (3)	0.44
			SKOV3/VP	5 (4)	0.61

5 * DNA コピー数は耐性株でのコピー数（親株でのコピー数）を示した。

 ** ターゲット遺伝子と対照遺伝子（GAPDH）の発現量の比を求め、各薬剤耐性細胞の親株の値を 1 としそれに対する比で表した。

(略号) DCK : デオキシシチジンキナーゼ遺伝子

 TOP1 : トポイソメラーゼ 1 遺伝子

10 TOP 2 A : トポイソメラーゼ 2 A 遺伝子

15 親株と比較してシトシンアラビノシド耐性白血病（K562/AC）細胞は DCK 遺伝子の FISH 法により求めたコピー数は 1 コピーであった。これは Ara-C 耐性細胞における 2 対の遺伝子中で 1 対の欠失を示している（図 1 E と F）。DCK 遺伝子の発現はヒト白血病 K562 細胞で明らかに検出されたが、シトシンアラビノシド耐性白血病 K562/AC 細胞では検出されなかった。大腸癌 HT-29 細胞は TOP1 遺伝子を 5 コピー有しているが、カンプトテシン耐性大腸癌 HT-29/CPT 細胞では 2 コピーであり、顕著に低下していた（図 1 G と H）。同様に、親株胃癌（St-4）細胞では TOP1 のコピー数は 6 コピーであったが、カンプトテシン耐性胃癌（St-4/CPT）細胞では 3 コピー

に減少し、3種類のカンプトテシン耐性細胞株ではすべて3コピー以下に減少していた。TOP2A 遺伝子のコピー数はそれぞれの親株と比較して、カンプトテシン耐性大腸癌 HT-29/ETP 細胞、エトポシド耐性白血病 (K562/etop20 及び K562/etop80) 細胞で減少し、TOP2A 遺伝子発現は5種類すべてのエトポシド耐性細胞株で低下していた。

従って、DCK 遺伝子、TOP1 遺伝子及び TOP2A 遺伝子のコピー数の減少は制癌剤の耐性と密接に関係しており、クロモソームのこれらの遺伝子の増幅並びに欠失を解析することは癌細胞の制癌剤耐性能を検査する上で極めて重要である。

10 【実施例6】 癌細胞及び癌組織の薬剤耐性能を診断する CGH アレイの作成

ABC トランスポーターファミリーに属する ABCA3 遺伝子、ABCB1 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB10 遺伝子、ABCB11 遺伝子、ABCC1 遺伝子、ABCC4 遺伝子、ABCC9 遺伝子、ABCD3 遺伝子、ABCD4 遺伝子、ABCE1 遺伝子及び ABCF2 遺伝子はそれぞれ BAC クローン、RP11-304L19、RP11-212B1、RP11-803J6、
15 RP11-606P1、RP4-613A2、RP11-704B8、RP11-516F7、RP11-124D15、RP11-729I10、RP11-272P3、RP5-919J22、RP11-543H9 及び RP4-548D19 に含まれている。BCL2 ファミリーに属する BCL2L2 遺伝子、MCL1 遺伝子及び BCL2L10 遺伝子はそれぞれ BAC クローン、RP11-124D2、RP11-243G22 及び RP11-337B11 に含まれる。これらの BAC DNA を4塩基認識酵素 RsaI で消化した後アダプターを加えてライゲーションを行った。その後、アダプターの配列をプライマーに用いて PCR を行い、遺伝子増幅を行った（この増幅工程を無尽蔵化と言う）。コントロール DNA として、上記
20 以外の5種類の BAC DNA (RP11-98A20、RP11-252O11、RP11-357G3、RP11-196F4 及び RP11-736A8) を無尽蔵化して調製した。

無尽蔵化した DNA をインクジェット式プリンターを用いてアミノ化オリゴヌクレ
25 オチド固定化アレイ用スライドガラスに Triplicate にスポットすることにより DNA 定着基盤を作成した。

健常者組織に由来する DNA を Cy5 で標識し、癌患者より摘出した癌組織に由来する DNA を Cy3 で標識する。その混液を DNA 定着基盤上でハイブリダイゼーションを行い、そのアレイをスキャンし、Cy3 のシグナルと Cy5 のシグナルを標準化した後
30 Cy3/Cy5 の強度比を求める。その比が2であれば DNA 定着基盤にプリントした遺伝子を含むゲノムの領域が癌組織で2倍に増幅、その比が4であれば4倍に増幅してい

ることを示す。

産業上の利用可能性

- ヒト ABC トランスポーター系遺伝子、BCL2 ファミリー遺伝子または DNA 合成関
- 5 連遺伝子群は、制癌剤耐性に密接に関連している。従って、本発明により、癌細胞の染色体上でのこれらの遺伝子領域の増幅及び欠失を調べることにより、癌細胞の制癌剤耐性を判定することが可能である。その結果、癌患者の患部の細胞が制癌剤耐性かどうか容易に診断することが可能である。これは患者個人に適切な化学療法即ちオーダーメイド医療を可能にし、制癌剤耐性能獲得に基づく奏効率の極めて低い化学療法
- 10 を避けることが可能であり、かつ、患者の Quality of Life の無用な低下を防ぐことができる。

請求の範囲

1. 被験癌細胞における、ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB
10 遺伝子、ABCC4 遺伝子、ABCC9 遺伝子、ABCD3 遺伝子、ABCD4 遺伝子、
5 ABCB1 遺伝子、ABCF2 遺伝子、BCL2L2、BCL2L10、BCL2L1、および、BCL2A1
からなる群の ABC トランスポーター系遺伝子または BCL2 ファミリー遺伝子か
ら選ばれる 1 種以上の遺伝子の増幅を検出することにより、当該被験癌細胞にお
ける制癌剤に対する薬剤耐性の獲得を検出する、検出方法。
2. ABCA3 遺伝子の増幅がエトポシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
10 ABCB6 遺伝子の増幅がカンプトテシン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCB8 遺伝子の増幅がシスプラチン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCB10 遺伝子の増幅がカンプトテシン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCC4 遺伝子の増幅がシスプラチン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCC9 遺伝子の増幅がエトポシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
15 ABCD3 遺伝子の増幅がエトポシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCD4 遺伝子の増幅がアドリマイシンに対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCB1 遺伝子の増幅がカンプトテシン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
ABCF2 遺伝子の増幅がシスプラチン類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、
BCL2L2 遺伝子の増幅が、カンプトテシン類、シスプラチン類、エトポシド類
20 またはシトシンアラビノシド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、BCL2L10
遺伝子の増幅が、カンプトテシン類、シスプラチン類またはシトシンアラビノシ
ド類に対する薬剤耐性獲得の指標であり、BCL2L1 遺伝子の増幅が、カンプトテ
シン類、シスプラチン類、エトポシド類またはシトシンアラビノシド類に対する
薬剤耐性獲得の指標である、請求項 1 記載の検出方法。
- 25 3. 検出方法を、CGH 法、フローサイトメトリー法、ELISA 法、DNA チップ法、
または、定量 PCR 法により行う、請求項 1 または 2 の検出方法。
4. 検出方法を CGH 法または DNA チップ法により行う、請求項 1 または 2 記載の
検出方法。
5. CGH 法または DNA チップ法に用いる基盤が、ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、
30 ABCB8 遺伝子、ABCB10 遺伝子、ABCC4 遺伝子、ABCC9 遺伝子、ABCD3
遺伝子、ABCD4 遺伝子、ABCB1 遺伝子、ABCF2 遺伝子、BCL2L2 遺伝子、

- BCL2L10遺伝子、BCL2L1遺伝子、および、BCL2A1遺伝子からなる群のABCトランスporter系遺伝子またはBCL2ファミリー遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子を含むDNAの定着基盤である、請求項4記載の検出方法。
6. 上記DNAの定着基盤が、さらに、ABCB1 遺伝子、ABCC1 遺伝子、ABCB11 5 遺伝子、BCL2 遺伝子、MCL1 遺伝子、BCLXL 遺伝子、DCK1 遺伝子、TOP1 遺伝子、および、TOP2A 遺伝子からなる群のABCトランスporter系遺伝子、BCL2 ファミリー遺伝子またはDNA合成関連遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子を含むDNA定着基盤である、請求項5記載の検出方法。
7. それぞれ異なる蛍光色素で標識した対照DNAと薬剤耐性の獲得を検出する対象 10 となる被験癌細胞のDNAを、上記DNA定着基盤上において同時に接触させてハイブリダイズを行うことにより得られる蛍光色を指標として、被験DNAの特定領域の増幅または欠失を定量的に検出する、請求項4～6のいずれかに記載の薬剤耐性獲得癌細胞の検出方法。
8. 上記DNA定着基盤に定着されるDNAと被験DNAと対照DNAが、ゲノムDNA 15 である、請求項7記載の薬剤耐性獲得癌細胞の検出方法。
9. ABCA3 遺伝子、ABCB6 遺伝子、ABCB8 遺伝子、ABCB10 遺伝子、ABCC4 遺伝子、ABCC9 遺伝子、ABCD3 遺伝子、ABCD4 遺伝子、ABCE1 遺伝子、ABCF 2 遺伝子、BCL2L2 遺伝子、BCL2L10 遺伝子、BCL2L1 遺伝子、および、BCL2A1 20 遺伝子からなる群のABCトランスporter系遺伝子またはBCL2ファミリー遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子を含むDNAが定着している、DNAの定着基盤。
10. さらに、ABCB1 遺伝子、ABCC1 遺伝子、ABCB11 遺伝子、BCL2 遺伝子、MCL1 遺伝子、BCLXL 遺伝子、DCK1 遺伝子、TOP1 遺伝子、および、TOP2A 25 遺伝子からなる群のABCトランスporter系遺伝子、BCL2ファミリー遺伝子またはDNA合成関連遺伝子から選ばれる1種以上の遺伝子を含む複数種類のDNAが定着している、請求項8記載のDNAの定着基盤。
11. 基盤に定着させる複数種類のDNAが、ゲノムDNA、cDNA、または、合成オリゴヌクレオチドである、請求項9または10記載のDNAの定着基盤。
12. 複数種類のDNAがゲノムDNAであり、かつ、当該ゲノムDNAが、BAC DNA、 30 YAC DNA、または、PAC DNA の遺伝子増幅産物である、請求項11記載のDNAの定着基盤。

図 1

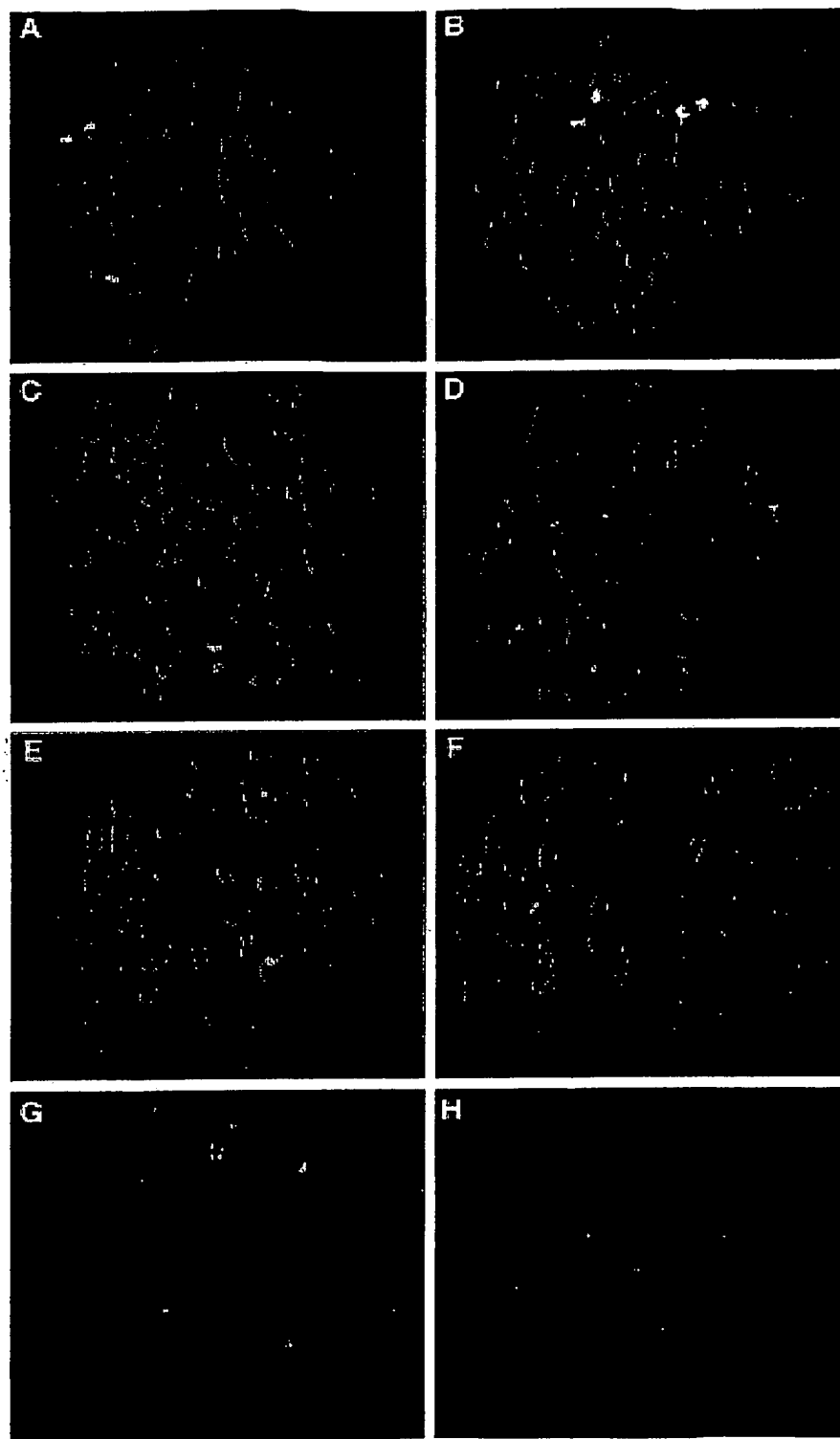


図 1 (続き)

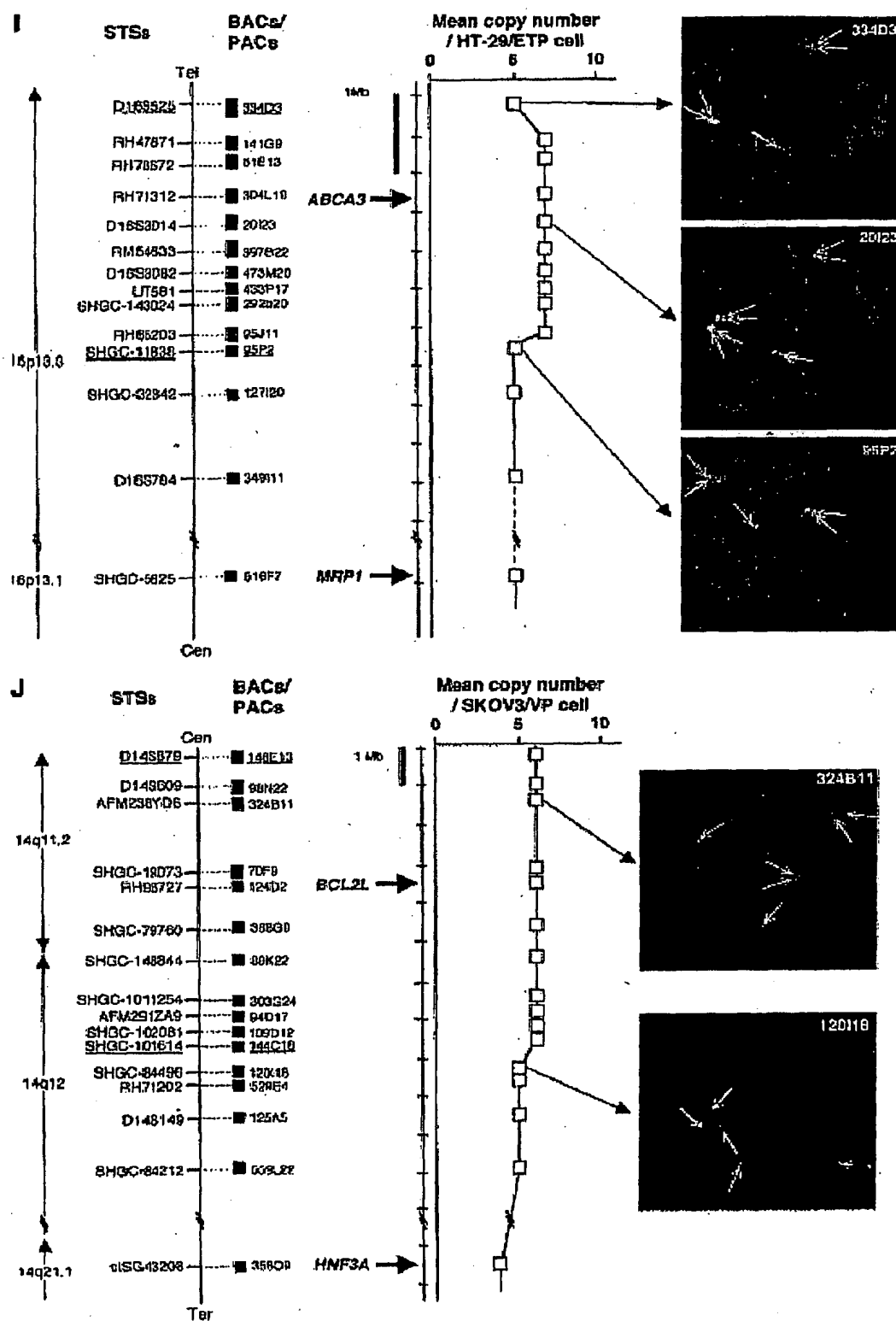
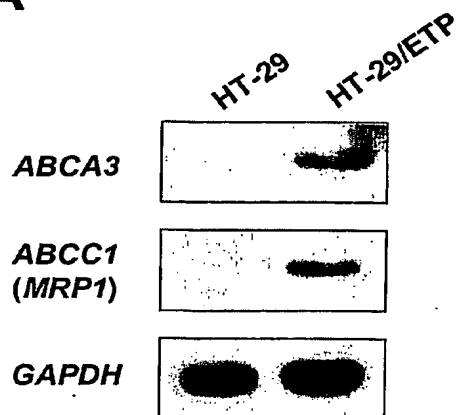
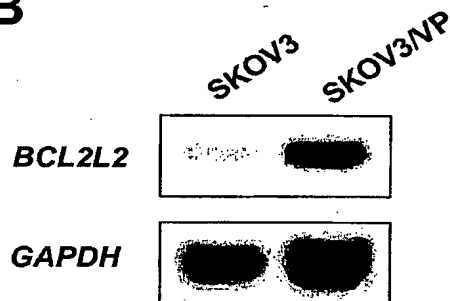


図 2

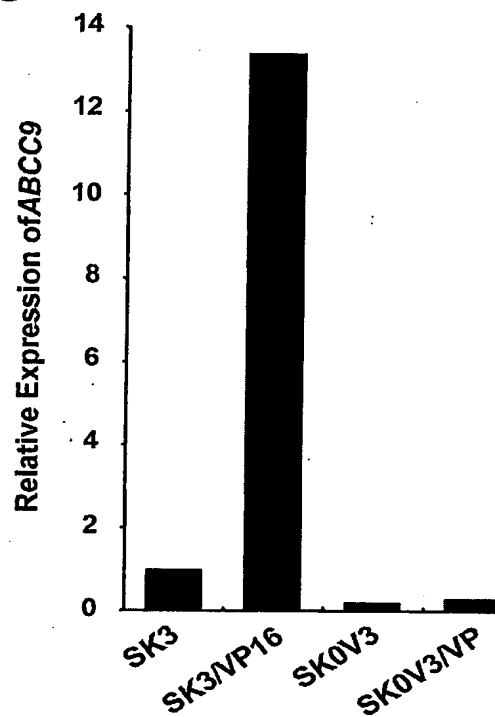
A



B



C



3

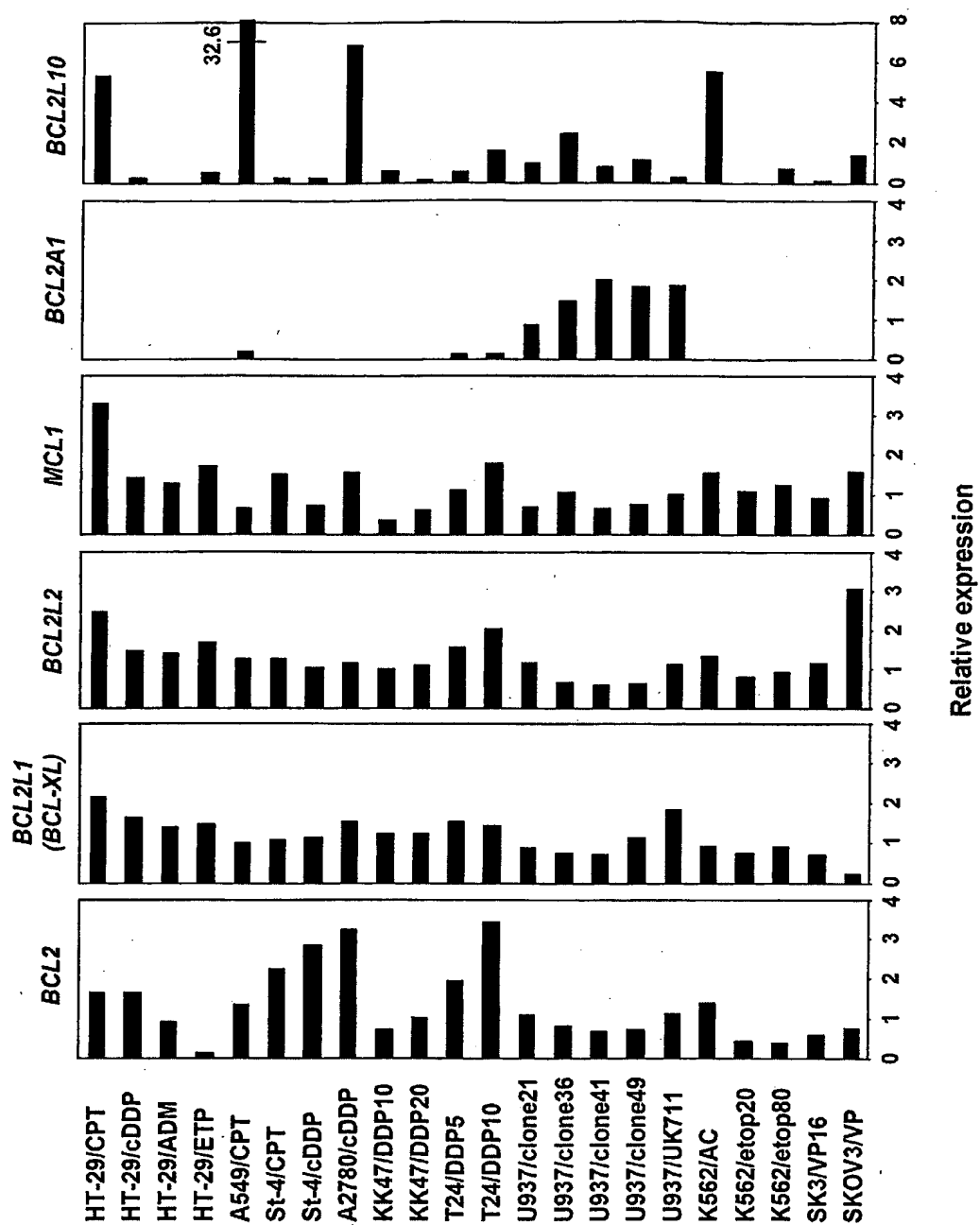
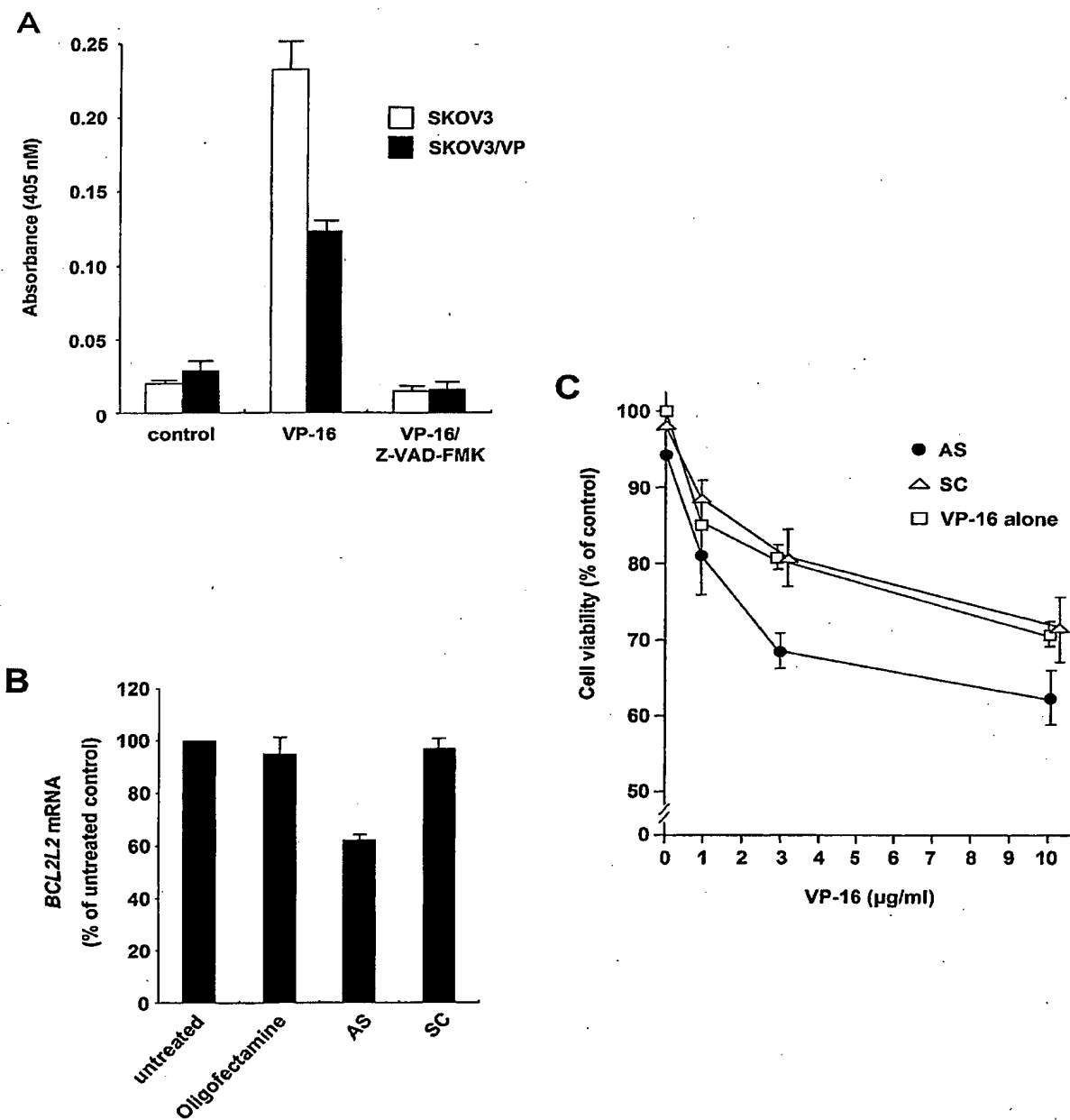


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.
Inazawa, Johji

<120> 薬剤耐性を獲得した癌細胞の検出方法

<130> PBM95PCT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 1
tataagctga ggcagaaggg 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 2
tcagcactgt cctcactgat 20

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 3
agcctaccac ctcccctaga a 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 4
aagatcccct ccaccatccg a 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ZHANG J.P. et al., Alysis of gene expression profiles in human HL-60 cell exposed to cantha ridin using cDNA microarray., Int.J.Cancer., 10 January, 2004 (10.01.04), Vol.108, No.2, pages 212 to 218	<u>1, 3-5, 7-9,</u> <u>11, 12</u> 2
<u>Y</u> <u>A</u>	KLUGBAUER N. et al., Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multi-drug resistance-associated protein., FEBS Lett. 1996, Vol.391(1-2), pages 61 to 65	<u>1, 3-12</u> 2
Y	EFFERTH T. et al., The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside., Curr.Mol.Med., 2001, Vol.1, No.1, pages 45 to 65	1, 3-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 May, 2004 (27.05.04)Date of mailing of the international search report
15 June, 2004 (15.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001574

C (Continuation). . DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TURTON N.J. et al., Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance., Oncogene, 2001, Vol.20, pages 1300 to 1306	6,10
T	YASUI K. et al., Alteratin in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance., Cancer Research, 15 February, 2004 (15.02.04), Vol.64, pages 1403 to 1410	1-12
A	ZENG H. et al., Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents., Cancer Res., 1999, Vol.59, No.23, pages 5964 to 5967	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001574

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Discussion on the inventions as set forth in claims 1 to 12 relating to ABCA3, ABCB6, ABCB8, ABCB10, ABCC4, ABCC9, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF2, BCL2L2, BCL2L10, BCL2L1 and BCL2A1 genes indicates that these inventions have a common matter of "a method of detecting amplification in a gene serving as an indication of drug resistance to a carcinostatic agent in a test cancer cell".

Referential documents 1 to 4 (see below) report methods of detecting resistance of a cancer cell to a carcinostatic agent by measuring the expression amount of an ABC transporter gene or a BCL2 family gene which relates to the resistance to a carcinostatic agent of a cancer cell. Such being the case, it appears the above common matter had been (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
"The inventions relating to ABCA3 in 1 to 12."

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001574

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

publicly known before the application of the present case. Thus, the common matter falls within the category of prior art and, therefore, cannot be considered as a special technical matter in the meaning within PCT Rule 13.2.

Thus, the inventions according to claims 1 to 12 cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Referential document 1: WO 02/28894 A1

Referential document 2: Cancer Research, 2001, Vol.61, p.2827-2832

Referential document 3: American Journal of Clinical Pathology, 2000, Vol.113, p.219-229

Referential document 4: Oncogene, 2001, Vol.20, No.11, p.1300-1306

Thus, the International Searching Authority recognizes that claims 1 to 12 in the present case, as a whole, have 14 groups of inventions in total respectively relating to ABCA3, ABCB6, ABCB8, ABCB10, ABCC4, ABCC9, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF2, BCL2L2, BCL2L10, BCL2L1 and BCL2A1 genes.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	ZHANG J.P. et al., Alysis of gene expression profiles in human HL-60 cell exposed to cantharidin using cDNA microarray., Int J Cancer. 2004 Jan 10, Vol.108, No.2, p.212-218	<u>1, 3-5, 7-9, 11, 12</u> 2
<u>Y</u> A	KLUGBAUER N. et al., Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein., FEBS Lett. 1996, Vol.391(1-2), p.61-65	<u>1, 3-12</u> 2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.05.2004

国際調査報告の発送日

15.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐久 敬

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EFFERTH T. et al., The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. Curr. Mol. Med., 2001, Vol. 1, NO. 1, p. 45-65	1, 3-12
Y	TURTON N. J. et al., Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance., Oncogene, 2001, Vol. 20, p. 1300-1306	6, 10
T	YASUI K. et al., Alteratin in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance., Cancer Research, Feb 15 2004, Vol. 64, p. 1403-1410	1-12
A	ZENG H. et al., Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. Cancer Res., 1999, Vol. 59, NO. 23, p. 5964-5967	2

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1～12のABCA3、ABCB6、ABCB8、ABCB10、ABCC4、ABCC9、ABCD3、ABCD4、ABCE1、ABCF2、BCL2L2、BCL2L10、BCL2L1、BCL2A1の各遺伝子に係る発明について検討すると、これらに共通の事項は「被験癌細胞において、制癌剤に対する薬剤耐性の指標である遺伝子の増幅を検出する方法」である。

ここで、参考文献1～4(下記参照)にはそれぞれ、ABCトランスポーター遺伝子やBCL2ファミリー遺伝子が癌細胞の制癌剤耐性に関与しており、それらの発現量を測定することによって、癌細胞の制癌剤耐性を検出する方法が記載されている。してみると、上述した共通事項は本願出願前から公知であったと認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえない。

(以下、「特別ページ」に続く)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

「1-12のABCA3に係る部分の発明」

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

「第III欄」の続き

よって、本願請求の範囲1～12に係る発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえない。

参考文献1：WO 02/28894 A1

参考文献2：Cancer Research, 2001, Vol.61, p.2827-2832

参考文献3：American Journal of Clinical Pathology, 2000, Vol.113, p.219-229

参考文献4：Oncogene, 2001, Vol.20, No.11, p.1300-1306

よって国際調査機関は、本願請求の範囲1～12全体がABCA3、ABCB6、ABCB8、ABCB10、ABCC4、ABCC9、ABCD3、ABCD4、ABCE1、ABCF2、BCL2L2、BCL2L10、BCL2L1、BCL2A1それぞれの遺伝子に係る発明の計14個の発明群からなるものであると認める。